

(19) Japanese Patent Office

Publication of Unexamined Patent Applications

(11) JP-A 48-76592

(43) Date of Publication: October 15, 1973

(21) Patent Application No. 46-74616

(22) Filing Date: September 27, 1971

Request for examination: not requested (total 4 pages)

JPO Reference Number: 7003 4A

6514 4A

(52) Japanese Classification: 113 E6

113 A2

1. Title of the Invention

Compositions for Measurement of Urinary Bacteria and
Method for Measurement

2. The Number of Invention Claimed in Claims: 2

3. Inventors

Shichiro Kakimoto (and other 3 persons)

35-29, North 15, West 14, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido

4. Patent Applicant

Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.

Edobashi 3-1, Nihonbashi, Chu-o-ku, Tokyo, Japan

Representative: Ken-ichi Kohno

5. Representative

Patent Attorney (6870)

Yoshi-cho 1-3, Nihonbashi, Chu-o-ku, Tokyo, Japan

Specification

1. Title of the Invention

Compositions for Measurement of Urinary Bacteria and Method for Measurement

2. Claims

(1) A method for measuring the number of urinary bacteria which comprises incubating urine with a 2,3-diphenyl-5-(2-thienyl)-tetrazolium halide and a buffering agent capable of adjusting the medium at pH 7.5-8, and then determining occurrence of color for counting the number of urinary bacteria.

(2) A composition for use in measurement of the number of urinary bacteria comprising a 2,3-diphenyl-5-(2-thienyl)-tetrazolium halide and a buffering agent capable of adjusting the medium at pH 7.5-8.

3. Detailed Description of the Invention

A variety of methods for rapidly testing the number of urinary bacteria of 10^5 cells/ml or more by chemical means have been devised. These chemical methods include a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (hereinafter abbreviated to as TTC) test, nitrite method, catalase method, as well as a method for measuring urinary glucose. Among these methods, TTC test is considered to be a most reliable method, but it is not useful for urgent judgment since it requires much time over 4 hours for a culture test, and the extent of its use is

considerably limited. This is a disadvantage of these methods.

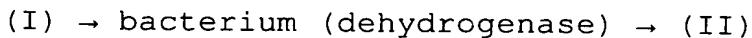
In addition, the number of urinary bacteria is considered to be 10^5 cells/ml or more; the detection limit of the TTC test, however, is 10^6 cells/ml or more when the culture is conducted in a usual condition at 37°C for 4 hours; thus, this test is insufficient in its sensitivity, too.

In this situation, the present inventors investigated in various ways in order to remove these disadvantages and found that the use of 2,3-diphenyl-5-(2-thienyl)-tetrazolium halide (hereinafter, when the halogen is chlorine atom, abbreviated to as STC) is very effective in discrimination of urinary bacteria at an early stage in comparison with the so far used TTC.

The present invention was completed based on this finding. In the method of the invention, STC is used in place of TTC, and the method is characterized by rapidly detecting the urinary bacteria of 10^5 cells/ml or more.

The detection method for urinary bacteria according to the invention is based on that STC (I) is readily reduced by dehydrogenase present in urinary bacteria to form a water-insoluble red or reddish violet pigment 2,3-diphenyl-5-(2-thienyl)-formazan (II).

Reaction Scheme



(wherein X represents a halogen atom)

STC is reduced more easily than other homologues of tetrazolium compounds, for example, 2,3,5-tetrazolium chloride, neotetrazolium chloride, and alpha-naphthyltetrazolium, by a dehydrogenase of urinary bacteria, for example, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella* and other gram-negative bacilli; thus, STC is very effective in discrimination of bacterial urine. In addition, STC has no growth inhibitory effect for bacteria; this is a great character of STC since there is no influence on the growth of bacteria during incubation.

According to the invention, a urine sample is added to an alkaline buffer in which STC has been dissolved, and incubated at 37°C for 30 minutes or longer to determine the coloring of formazan of reddish violet or occurrence of deposit. That is, when there is 10^5 cells/ml or more of bacteria, formazan is generated within a very short period of time, by which the urine sample is diagnosed to contain bacteria.

The diagnostic agent of the invention comprises STC and an alkaline buffer. The alkaline buffer includes sodium hydrogen phosphate or potassium hydrogen phosphate, or alternatively sodium hydrogen phosphate or potassium hydrogen phosphate and sodium dihydrogen phosphate or potassium dihydrogen phosphate. The composition of the diagnostic agent may preferably be made so as to contain 0.08-1 mg, particularly 0.15 mg of STC for 2 ml of sample urine. The alkaline buffer

may preferably be used in an amount with which the sample urine is adjusted at pH 7.5-8; particularly, it is appropriate to use 20-55 mg of sodium hydrogen phosphate.

The diagnostic agent of the invention has to be prepared aseptically in view of its character; so, a bacterial filtration method can be utilized, or alternatively it is possible to utilize high-pressure steam sterilization since STC is stable to heat. The diagnostic agent according to the invention may be in any form of aqueous solutions or freeze dried powder derived from the aqueous solution.

A urine sample to which had been added a certain amount of *Escherichia coli* or *Proteus vulgaris* was added to an STC solution prepared according to the invention, and its detection sensitivity was compared with that of TTC test. In a case of the bacterial number 1.0×10^5 cells/ml, STC produced reddish brown deposit of formazan after the lapse of 4 hours in both bacteria, allowing the determination of the number of bacteria. On the other hand, in the TTC test conducted in the same manner, formation of the formazan could not be recognized even after the lapse of 5-6 hours, not allowing determination of the bacterial number in urine containing approximately 10^5 cells/ml. In addition, it was found that STC produced reddish brown formazan more rapidly than TTC, and when the number of bacteria is in the same level, STC generates color more rapidly than TTC by 30 minutes to 2 hours or more. For example, when

the number of bacteria in urine is 10^6 cells/ml, the time required for generation of formazan was 2 hours for STC in contrast with 4 to 5 hours for TTC. When the bacterial number is 10^7 cells/ml, the result was 30 minutes for STC and 1 hour for TTC. Particularly, when the bacterial number is small, STC is characterized in that the detection speed is much quicker than that by TTC.

As mentioned above, the measuring agent and method of the invention have a very important significance because bacterial urine can be discriminated exactly and at an early stage.

特許願 (特許法第38条丸
だし書きによる出願)

昭和46年9月27日

(2000円)

特許庁長官 井土武久

1. 発明の名称
尿中細菌測定用組成物並びに測定法

2. 特許請求の範囲に記載された発明の数 2

3. 発明者
住所 北海道札幌市北15条西14丁目35番地29
氏名 竹本七郎(他3名)

4. 特許出願人
住所 東京都中央区日本橋江戸橋3丁目1番地
名称 第一化学薬品株式会社
代表者 河野賢一

5. 代理人
住所 東京都中央区日本橋芳町1丁目3番地
共同ビル 電話(669)0905
氏名 (6870)井土武久

特許庁
46.9.27
出願第2種
受付

⑯ 日本国特許庁
公開特許公報

⑪特開昭 48-76592
⑫公開日 昭48.(1973)10.15
⑬特願昭 46-74616
⑭出願日 昭46(1971)9.27
審査請求 未請求 (全4頁)

厅内整理番号 ⑯日本分類
7003 4A 113 E6
6514 4A 113 A2

明細書

1. 発明の名称

尿中細菌測定用組成物並びに測定法

2. 特許請求の範囲

(1) 尿中の細菌数を測定する場合に、尿を2,3-ジフェニル-5-(2-チエニル)-テトラゾリウムハライド、およびpH 7.5~8に調整することのできる緩衝剤と共に培養後、呈色の有無を判定することを特徴とする尿中細菌数の測定法。

(2) 2,3-ジフェニル-5-(2-チエニル)-テトラゾリウムハライド及びpHを7.5~8に調整し得る緩衝剤から成る尿中細菌数測定用組成物。

3. 発明の詳細な説明

本発明は尿単位容量当たりの細菌数を迅速に測定することのできる尿中細菌測定用組成物並びにその測定方法に関するものである。

尿路感染症の場合尿中で細菌が増殖して細菌尿(感染尿)の症状を呈する。そのため尿路感染症を診断するにあたって尿中細菌を検査することが最も重要視される。診断上は感染症とその他の原因による汚染尿とを区別する必要があり、現在では尿1ml当たりの細菌数が10⁵コ/ml以上あつた場合尿路感染症による細菌尿(感染尿)としている。

尿の定量培養は汚染尿と真の感染尿とを区別するに最も信頼し得る方法であり、多くの大学病院や大病院において行なわれているが、この方法は培養設備と高度の技術および

相当な時間が要求されるので、日常の多数の患者尿のスクリーニング法としてどこでも行なえるといふものではない。そのため多くの実地臨床医によつて、細菌尿を簡単に診断する方法が望まれ、化学的な方法で尿中の

10⁵コ/ml以上の細菌数を迅速に検査する種々の方法が考案された。而してこの化学的方法としては2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド(以下TTCと略す)テスト、亜硝酸塩法、カタラーゼ法さらには尿中のグルコースを測定する方法などがある。これらの中でTTCテストはもつとも信頼すべき方法とされているが、培養試験に4時間以上も要するので即時の判定には役立たず、利用範囲がかなり制限されるといふ欠点があ

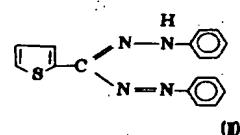
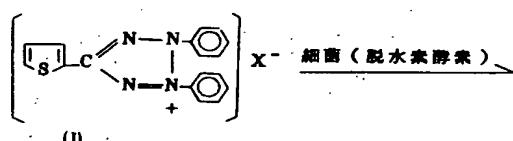
る。また細菌尿は菌数が10⁵コ/ml以上とされているが、TTC法で通常用いられる37℃で4時間培養した場合の細菌数の検出限界は10⁵コ/ml以上であり、感度の点からも十分とはいい難い。

そこで、本発明者らは斯る欠点を除去せんと種々研究を重ねた結果、従来使用せられてゐるTTCに比較し2,3-ジフェニル-5-(2-チエニル)-テトラゾリウムハライド(以下ハロゲンが塩素原子である場合の本化合物をSTCと略称する)が細菌尿の早期識別に極めて有効であることを知見した。

本発明は斯る新知見に基づいて完成されたもので、TTCにかえてSTCを使用する方法であり、その特徴とするところは10⁵コ/ml

以上の細菌尿を迅速に検出することにある。

本発明による細菌尿の検出法はSTC(I)が尿中細菌の脱水素酵素によつて容易に還元されて赤色ないし赤紫色を呈する、水に不溶性の2,3-ジフェニル-5-(2-チエニル)-フオルマザン(II)を形成することに基づく。



STCは、他のテトラゾリウム化合物の同

族体、たとえば2,3,5-テトラゾリウムクロライド、ネオテトラゾリウムクロライドおよびアルフアナフチルテトラゾリウムなどに比べて、尿中細菌たとえばエシエリシア・コリ、プロテウス群、グレブシエラおよびその他のグラム陰性桿菌などの脱水素酵素によつて容易に還元されやすいため細菌尿の識別にきわめて有効である。さらにSTCは菌の発育阻止作用がないため、培養時に菌の発育に何ら影響を及ぼさないという大きな特徴がある。

本発明方法はSTCをアルカリ性の緩衝液に溶かしたものに被検尿を加えて37℃で30分以上培養の後に赤紫色のフオルマザンの呈色および沈殿の有無を判定する。すなわ

ち 10^6 コ/ ml 以上の菌数がある場合は極めて短時間内にフォルマザンが生成し、細菌尿であることが診断される。

本発明の診断剤は STC 及びアルカリ性緩衝剤よりなる。アルカリ性緩衝剤としてはリン酸一水素ナトリウム又はリン酸一水素カリウム、あるいはリン酸一水素ナトリウム又はリン酸二水素ナトリウム又はリン酸二水素カリウムなどが挙げられる。本診断剤の組成は検査尿 2 ml に対して STC が 0.08 ~ 1 ml、特に 0.15 ml になるようにするのが好ましく、またアルカリ性緩衝剤の量は検査尿の pH が 7.5 ~ 8 になるようになるのが好ましく、特にリン酸一水素ナトリウムを 2.0 ~ 5.5 ml 使用するのが好適であ

た。ところが同様に調製した TTC テストの場合には 5 ~ 6 時間経過してもフォルマザンの生成はみとめられず、 10^6 コ/ ml 前後の細菌尿の測定はできなかつた。さらに STC は TTC よりも速く赤紫色のフォルマザンを形成し、同一菌数の場合 30 分 ~ 2 時間以上速く呈色することを見出した。たとえば菌数 10^6 コ/ ml の場合、フォルマザン生成時間は STC では 4 時間ないし 5 時間であつた。菌数 10^6 コ/ ml の場合、フォルマザン生成時間は STC では 30 分 TTC で 1 時間という結果を得た。特に菌数の少ない場合、STC は TTC に比べて極めて検出速度が速いという特徴がある。

以上の如く本発明の測定剤及び方法は細菌

ある。特開 昭48-76592(3)

本診断剤はその性質上無菌的に製造する必要があり、その方法としては細菌汚染を利用して、STC は熱に対して安定であるので高圧蒸気滅菌の使用も可能である。本発明による診断剤は水溶液状あるいはそれを凍結乾燥した粉末状のいずれでもかまわない。

本発明にしたがつて調製した STC 溶液に、エシエリシア・コリ (*Escherichia Coli*) 又はプロテウス・ブルガリス (*Proteus Vulgaris*) を所定量ませた尿を加えて、その検出感度を TTC テストと比較してみた。菌数 1.0×10^6 コ/ ml の場合、STC では、ともに 4 時間後にそれぞれ赤紫色のフォルマザンの沈殿を生じ、菌数の測定が可能であつ

尿を確実にかつ早期に識別できるという点で臨床検査上極めて意義がある。

次に本発明の方法ならびにその効果について実施例を挙げて説明する。

実施例 1

STC 30 ml とリン酸一水素ナトリウム 1.0 g を蒸留水で溶かして 100 ml とする。この液をミリポアフィルターで無菌的に戻過して滅菌した試験管に 0.5 ml ずつ小分けして密栓保管する。あるいはこれを凍結乾燥して粉末状で保管してもよい。次にヒト尿をミリポアフィルターで無菌的に戻過してプロテウス・ブルガリス (*Proteus Vulgaris*) を適量加えて細菌尿を調製した。この菌数は定量培養法で測定した。上で調製した STC

試液 0.5 ml に細菌尿 2 ml を加えてよく振り、

37°C で 4 時間培養して呈色の有無を調べた。
比較のため同様に調製した TTC テストもあわせて使用した。その結果は表 - 1 の如くである。

表 - 1

菌数 試液	$3 \times 10^4 / ml$	$5.5 \times 10^5 / ml$	$1.0 \times 10^6 / ml$
S TC 試液	10 分 *	20 分	30 分
T TC 試液	10 分	20 分	60 分

$1.0 \times 10^6 / ml$	$1.0 \times 10^5 / ml$	$1.0 \times 10^4 / ml$
120 分	240 分	(-)
240 分	(-)**	(-)

* 時間はいずれもフォルマザンが生成し着

coli) を使って実施例 1 と同様の実験を行なつた。この結果は表 - 2 の如くである。

表 - 2

菌数 試液	$2 \times 10^4 / ml$	$2 \times 10^5 / ml$	$2 \times 10^6 / ml$
S TC 試液	15 分 *	60 分	120 分
T TC 試液	15 分	60 分	300 分

$2 \times 10^6 / ml$	$2 \times 10^5 / ml$
240 分	(-)
(-)**	(-)

* 及び ** は表 - 1 と同じ意味を示す。

表 - 2 から明らかな如く、 $2 \times 10^6 / ml$ の場合、S TC 試液では 2 時間で陽性になつたが、T TC の場合には 5 時間後でなければ陽性にならなかつた。

特開昭48-76592(4)
色し始めた時間を示す。

** 6 時間後にも着色せず。

表 - 1 から明らかな如く S TC 試液は細菌尿の限界値 $1 \times 10^6 / ml$ のものでも 4 時間で検出できた。しかし TTC 試液では $1.0 \times 10^6 / ml$ のものを 6 時間たつても検出できず $1.0 \times 10^6 / ml$ 以上の場合にはじめて検出できた。また同一細菌数の場合 S TC の検出速度は TTC に比べて極めて速かつた。S TC 試液は TTC 試液に比べて約 10 倍程度感受度が高い。

実施例 2

プロテウス・ブルガリス (Proteus vulgaris) の代りに細菌尿の主要起因菌であるエシエリシア・コリ (Escherichia

6. 添附書類の目録

- (1) 明細書 1通
- (2) 委任状 1通
- (3) 願書副本 1通

7. 前記以外の発明者

住 所 東京都杉並区善福寺4丁目19番10号
氏 名 長谷川 賢
住 所 千葉県市川市善谷5丁目11番14号
氏 名 中村 賢
住 所 千葉県船橋市金杉町746番地
氏 名 福永 典之